

Albert L. Lehninger / David L. Nelson / Michael M. Cox

Prinzipien der Biochemie

2. Auflage

Übersetzung herausgegeben von Harald Tschesche

Übersetzt von

Elke Buchholz, Ute Hempelmann, Stefan Müller-Becker,
Annette Sappok-Stang, Sebastian Vogel

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford

Originaltitel: Principles of Biochemistry. Second edition.
Deutsche Übersetzung herausgegeben von Prof. Dr. Harald Tschesche, Bielefeld.

Amerikanische Originalausgabe bei Worth Publishers, Inc., New York
© 1982 Worth Publishers, Inc.
© 1993 Worth Publishers, Inc.

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Lehninger, Albert L.:
Prinzipien der Biochemie / Albert L. Lehninger/David L. Nelson/
Michael M. Cox. Übers. hrsg. von Harald Tschesche. Übers. von Elke
Buchholz ... – 2. Aufl. – Heidelberg ; Berlin ; Oxford : Spektrum,
Akad. Verl., 1998

Einheitssacht.: Principles of biochemistry <dt.>
ISBN 3-8274-0325-1

© 1998 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin · Oxford

Die erste deutsche Auflage erschien 1987 bei Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in fremde Sprachen, sind vorbehalten.
Kein Teil des Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages photokopiert
oder in irgendeiner anderen Form reproduziert oder in eine von Maschinen verwendbare
Sprache übertragen oder übersetzt werden.

Lektorat: Karin von der Saal
Redaktion: Friedhelm Glauner, Katrin Wolf
Produktion: Karin Kern und Hans J. Münster
Texterfassung: Bernie's Schreibbüro, Heidelberg
Gesamtherstellung: wwK druck GmbH, Speyer

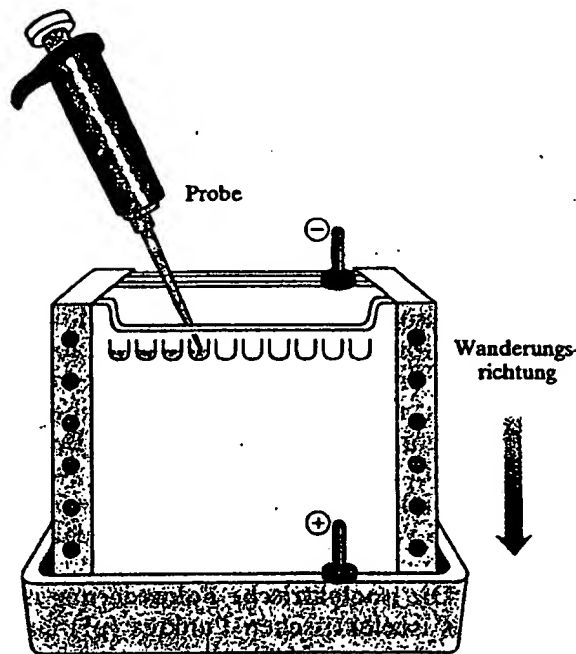
Titelbild: Seitenansicht der katalytischen Domäne der interstitiellen Collagenase aus
menschlichen Granulocyten, dargestellt als Ribbon-Plot mit dem aus fünf Strängen
bestehenden verdrehten Beta-Faltblatt (rote Pfeile), den drei Alpha-Helices und den
zwei Zink-Atomen (lila Kugeln), die katalytische und struktur-stabilisierende Funktion
haben, sowie zwei struktur-stabilisierenden Calciumatomen (blaue Kugeln).

Literatur: W. Bode, P. Reinemer, R. Huber, T. Kleine, S. Schnierer & H. Tschesche
(1994). „The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil
collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and
specificity.“ EMBO Journal, Vol. 13, No. 6, 1263–1269.
O. Reinemer, F. Grams, R. Huber, T. Kleine, S. Schnierer, M. Pieper, H. Tschesche &
W. Bode (1994). „Structural implications for the role of the N terminus in the
„superactivation“ of collagenases. A crystallographic study.“ FEBS Lett. 338, 227–233.

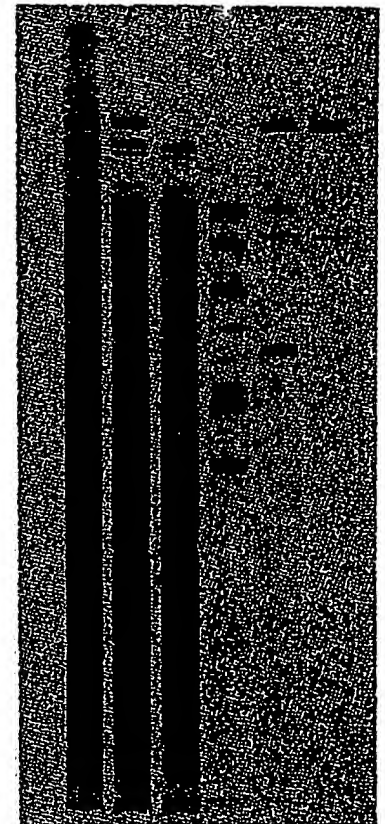
Proteine können durch Elektrophorese charakterisiert werden

Zusätzlich zur Chromatographie gibt es eine weitere wichtige Gruppe von Methoden zur Trennung von Proteinen. Sie basiert auf der Eigenschaft geladener Proteine, in einem elektrischen Feld zu wandern, in Prozeß, den man als **Elektrophorese** bezeichnet. Elektrophoretische Verfahren werden nur selten zur Reinigung großer Proteinmengen angewandt, weil normalerweise einfachere Alternativen verfügbar sind, und Proteine durch elektrophoretische Methoden häufig inaktiviert werden. Die Elektrophorese eignet sich jedoch hervorragend zur Analyse. Ihr Vorteil liegt darin, daß Proteine sowohl sichtbar gemacht als auch getrennt werden können, wodurch die Anzahl der in einer Mischung vorliegenden Proteine oder der Reinheitsgrad einer bestimmten Proteinpräparation schnell abgeschätzt werden kann. Außerdem ermöglicht die Elektrophorese die Bestimmung entscheidender Proteineigenschaften wie isoelektrischer Punkt und ungefähre molare Masse.

Bei einer Elektrophorese ist das elektrische Potential E die die Makromoleküle bewegende Kraft (Nucleinsäuren werden ebenso wie Proteine auf diese Weise getrennt). Die elektrophoretische Beweg-



(a)



(b)

4 Elektrophorese. a) Verschiedene Proben werden in die Taschen bzw. Vertiefungen am oberen Ende des Polysaccharid-Gels gefüllt. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Proteine in das Gel hinein. Das Gel reduziert Konvektionsströme, die durch kleine Temperaturgradienten hervorgerufen werden, und minimiert Proteinbewegungen, die auf andere Ursachen als das elektrische Feld zurückzuführen sind. Nach der Elektrophorese können die Proteine sichtbar gemacht werden, indem man sie z. B. mit Coomassie Brilliant Blue anfärbt, das an die Proteine, nicht aber an das Gel selbst bindet. Jede Bande auf dem Gel entspricht einem anderen Protein (oder einer Proteinuntereinheit). Kleinere Proteine liegen näher an der unteren Gelkante. Dieses Gel veranschaulicht die Reinigung des Enzyms RNA-Polymerase aus dem Bakterium *E. coli*. Die erste Bahn zeigt den ungereinigten Zellextrakt. Die nachfolgenden Bahnen zeigen die Proteine, die nach jedem Reinigungsschritt noch zugegen sind. Die gereinigte RNA-Polymerase besteht aus vier Untereinheiten, wie in der letzten Bahn auf der rechten Seite zu sehen ist.

lichkeit μ des Moleküls ergibt sich aus dem Verhältnis der Teilchengeschwindigkeit V zum elektrischen Potential. Sie kann auch als Quotient der Nettoladung des Moleküls Z und des Reibungskoeffizienten f ausgedrückt werden. Demnach ist:

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

Für die Elektrophorese von Proteinen verwendet man im allgemeinen Gele aus dem quervernetzten Polymer Polyacrylamid (Abb. 6.4). Die Polyacrylamid-Gele wirken als Molekularsiebe, indem sie die Wanderung von Proteinen annähernd proportional zu ihrer Masse oder ihrer molaren Masse verlangsamen.

Zur Abschätzung der Reinheit und der molaren Masse benutzt man gewöhnlich eine elektrophoretische Methode mit dem Detergens **Natriumdodecylsulfat** (englisch *sodium dodecyl sulfate*, SDS). SDS bindet an die meisten Proteine in einem Umfang, der der molaren Masse des Proteins annähernd proportional ist und zwar ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste (vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen, s. Kapitel 4). Das gebundene SDS steuert eine so hohe negative Nettoladung bei, daß die ursprüngliche Ladung des Proteins vernachlässigbar wird. Bei der Bindung von SDS ändert sich außerdem die native Konformation von Proteinen, so daß diese größtenteils eine ähnliche Struktur und somit ein ähnliches Verhältnis von Ladung zu Masse annehmen. Bei einer SDS-Elektrophorese werden Proteine deshalb fast ausschließlich entsprechend ihrer Masse bzw. ihrer molaren Masse getrennt, wobei kleinere Peptide schneller wandern. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Proteine durch Zugabe eines Farbstoffes wie Coomassie Brilliant Blue (Abb. 6.4b) sichtbar gemacht, der an Proteine, aber nicht an das Gel selbst bindet. Mit der SDS-Gelelektrophorese kann der Verlauf einer Proteinisolierung überprüft werden, weil die Anzahl der Proteinbanden mit fortschreitender Reinigung abnimmt. Vergleicht man die Positionen im Gel, zu denen Proteine mit bekannter molarer Masse wandern, mit der Position eines unbekannten Proteins, erhält man eine hervorragende Methode zur Bestimmung seiner molaren Masse (Abb. 6.5). Besitzt das Protein zwei oder mehrere verschiedene Untereinheiten, werden diese gewöhnlich durch die Behandlung mit SDS voneinander getrennt, so daß für jede eine einzelne Bande auftritt.

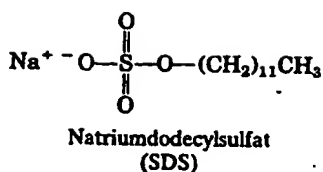
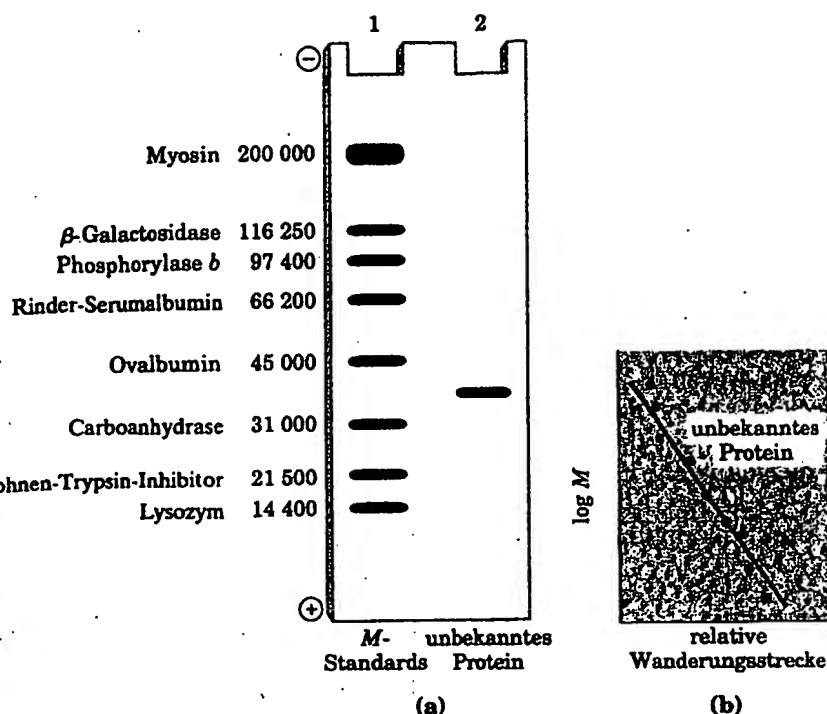


Tabelle 6.5: Isoelektrische Punkte einiger Proteine

	pI
Pepsin	~1.0
Ovalbumin	4.6
Serumalbumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hämoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrom c	10.7
Lysozym	11.0

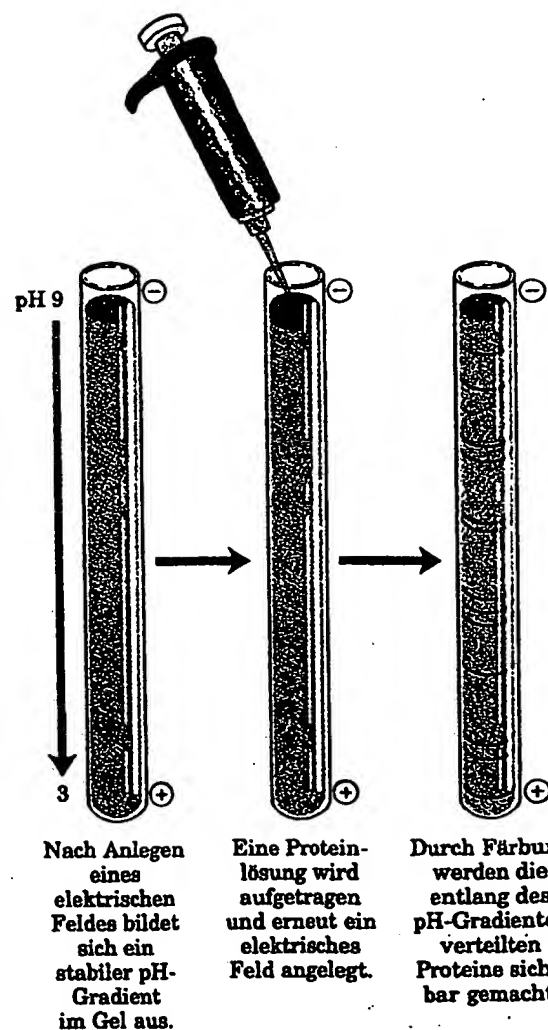
Die **isoelektrische Fokussierung** ist eine Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) eines Proteins (Abb. 6.6). Man erzeugt einen pH-Gradienten, indem man ein elektrisches Feld an ein Gel anlegt, das eine Mischung von niedermolekularen organischen Säuren und Basen (Ampholyte, s. Abschn. 5.1) enthält, so daß diese sich unterschiedlich verteilen. Wird eine Proteinmischung aufgetragen, wandert jedes Protein, bis es den pH-Wert erreicht hat, der seinem pI entspricht. Proteine mit verschiedenen isoelektrischen Punkten werden infolgedessen unterschiedlich über das gesamte Gel verteilt (Tab. 6.5).

Die Kombination dieser beiden elektrophoretischen Methoden in zweidimensionalen Gelen erlaubt die Auflösung komplexer Proteinmischungen (Abb. 6.7). Diese analytische Methode ist wesentlich empfindlicher als die isoelektrische Fokussierung oder die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese allein. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese können Proteine mit übereinstimmender molarer

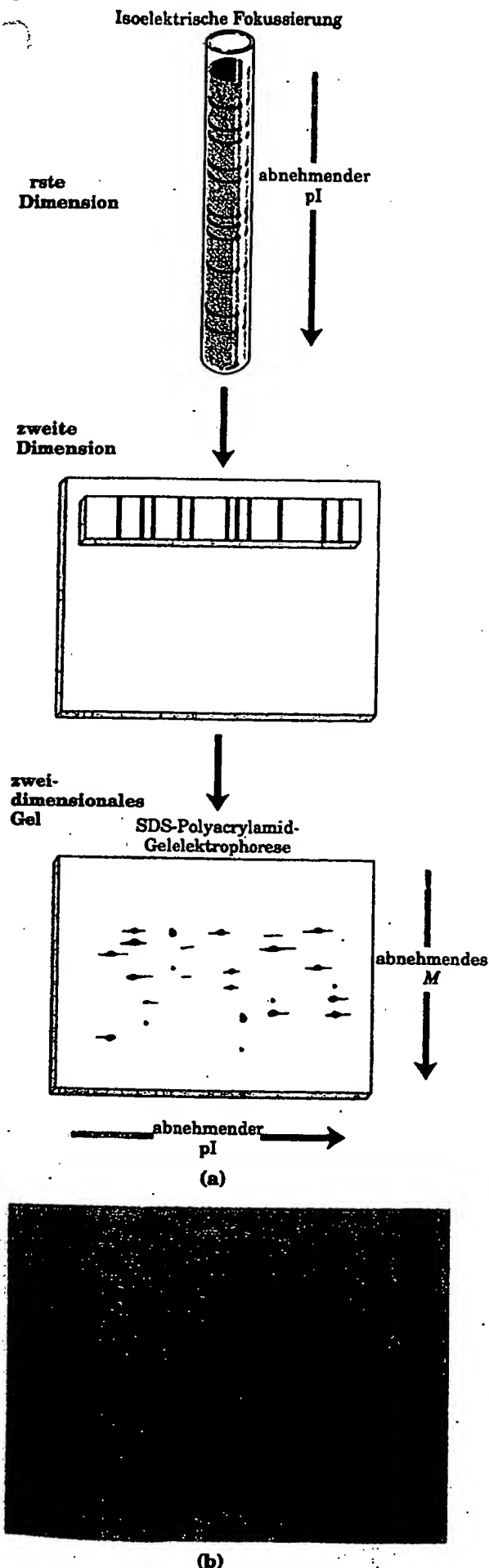


6.5 Abschätzung der molaren Masse eines Proteins. Die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins in einem SDS-Polyacrylamid-Gel steht in Beziehung zu seiner molaren Masse M . a) Proteine mit bekannter molarer Masse dienen als Standard bei der Gelelektrophorese (Bahn 1). Damit kann M eines unbekannten Proteins abgeschätzt werden (Bahn 2). b) Aus der graphischen Darstellung von $\log M$ der Markerproteine gegen die relative Wanderungstrecke während der Elektrophorese kann M eines unbekannten Proteins abgelesen werden.

Eine Ampholyt-Lösung wird in ein Gel einpolymerisiert.



6.6 Isoelektrische Fokussierung. Mit dieser Technik werden Proteine in Abhängigkeit von ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt. Im Gel wird durch Zusatz geeigneter Ampholyte ein stabiler pH-Gradient erzeugt. Eine Proteinmischung wird auf das Gel aufgetragen. Legt man ein elektrisches Feld an, drängen die Proteine in das Gel ein und wandern, bis sie einen pH-Wert erreicht haben, der ihren pI -Werten entspricht. Man beachte, daß die Nettoladung eines Proteins Null ist, wenn $pH = pI$.



Masse, aber unterschiedlichen pI-Werten oder Proteine mit gleichen pI-Wert und verschiedenen molaren Massen getrennt werden.

Ein neues Analyseverfahren, die **Kapillarelektrophorese**, gewinnt mittlerweile stark an Bedeutung. Sie verbindet die Vorteile klassischer elektrophoretischer Techniken mit den Möglichkeiten der Automatisierung und schnellen quantitativen Bestimmung der Proben. In der Kapillarelektrophorese (auch Kapillarzonenlektrophorese genannt) arbeitet man mit dünnen Quarzkapillaren ($25\text{--}100\ \mu\text{m}$) und sehr hohen Feldstärken ($100\text{--}300\ \text{V cm}^{-1}$), ca. zehnmal mehr als bei herkömmlichen elektrophoretischen Verfahren. Die Kapillaren können mit Puffer, SDS-Polyacrylamid-Gel oder Polyampholyten gefüllt sein, wodurch Trennungen nach Ladung und molarer Masse oder isoelektrische Fokussierung möglich sind. Die Probenvolumina betragen nur etwa $5\text{--}50\ \text{nL}$; deshalb enthalten kommerzielle Geräte zum Teil ausgeklügelte Injektionsvorrichtungen. Die Detektion erfolgt durch UV- oder Fluoreszenzmessungen, Leitfähigkeitsmessungen oder durch Kopplung mit Massenspektrometrie (vgl. Abschn. 11.4).

Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen dienen zur Quantifizierung und Lokalisierung von Proteinen

Verschiedene sensitive Analysemethoden wurden infolge der Untersuchung einer Proteinklasse entwickelt, die man als **Antikörper** oder **Immunglobuline** bezeichnet. Antikörpermoleküle treten im Blutserum und in bestimmten Geweben von Wirbeltieren als Antwort auf die Injektion eines **Antigens** auf, eines Proteins oder anderen Makromoleküls, das für dieses Individuum fremd ist. Jedes Fremdprotein löst die Bildung eines Satzes verschiedener Antikörper aus, die sich mit dem Antigen zu einem Antigen-Antikörper-Komplex verbinden können. Die Antikörperproduktion ist Teil eines allgemeinen Abwehrmechanismus bei Wirbeltieren, den man als **Immunantwort** bezeichnet.

Antikörper sind Y-förmige, aus vier Polypeptidketten bestehende Proteine. Sie besitzen zwei Bindungsstellen, die zu bestimmten strukturellen Merkmalen der Antigenmoleküle komplementär sind und die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes aus einander abwechselnden Antigen- und Antikörpermolekülen ermöglichen (Abb. 6.8). Ist genügend Antigen in einer Probe vorhanden, führt der Zusatz von Antikörpern oder Blutserum immunisierter Tiere zur Bildung eines quantifizierbaren Niederschlages. Ein solches Präzipitat wird nicht gebildet, wenn Serum nichtimmunisierter Tiere mit dem Antigen vermischt wird.

Antikörper sind für das Fremdprotein oder andere Makromoleküle, die ihre Bildung hervorrufen, hochspezifisch. Diese Spezifität macht sie zu wertvollen analytischen Reagenzien. Zum Beispiel bildet ein gegen Pferde-Serumalbumin gerichteter Kaninchenantikörper

6.7 Zweidimensionale Elektrophorese. a) Die Proteine werden zunächst durch isoelektrische Fokussierung getrennt und, nachdem das Gel horizontal auf ein zweites Gel gelegt wurde, zusätzlich einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. In diesem zweidimensionalen Gel zeigt die horizontale Trennung Unterschiede im pI, die vertikale Unterschiede in der molaren Masse. b) Mehr als 1000 verschiedene Proteine aus *E. coli* können mit Hilfe dieser Technik getrennt werden.